

A1

**DEMANDE  
DE BREVET D'INVENTION**

(21)

**N° 82 03777**

---

(54) Analogues de la somatostatine possédant une liaison du type hydrazide et médicaments en contenant.

(51) Classification internationale (Int. Cl. <sup>3</sup>). C 07 C 103/52; A 61 K 37/02.

(22) Date de dépôt ..... 5 mars 1982.

(33) (32) (31) Priorité revendiquée :

(41) Date de la mise à la disposition du  
public de la demande ..... B.O.P.I. — « Listes » n° 36 du 9-9-1983.

---

(71) Déposant : Société anonyme dite : SANOFI. — FR.

(72) Invention de : Pierre Perreaut, Catherine Cazaubon et Jean-Pierre Gagnol.

(73) Titulaire : *Idem* (71)

(74) Mandataire : Cabinet Beau de Loménie,  
55, rue d'Amsterdam, 75008 Paris.

Analogues de la somatostatine possédant une liaison du type hydrazide et médicaments en contenant.

La somatostatine est un tétradécapeptide de structure :

Ala-Gly-Cys-Lys-Asn-Phe-Phe-Trp-Lys-Thr-Phe-Thr-Ser-Cys

(les abréviations sont celles de l'IUPAC - J. Biol. Chem. 1972, 247, page 977)  
et qui inhibe les sécrétions endogènes d'hormone de croissance (GH), d'insuline et de glucagon. Ce même peptide réduit également de façon notable les taux des sécrétions digestives. La demi-vie biologique de la somatostatine est très courte (4 min environ), car elle est très vite hydrolysée in vivo par des enzymes protéolytiques ou bien dégradée par des aminopeptidases et des carboxypeptidases.

C'est pour cette raison qu'un grand nombre d'analogues ont été décrits par différents auteurs en vue d'obtenir soit des dissociations d'activité biologique ou bien une demi-vie biologique prolongée.

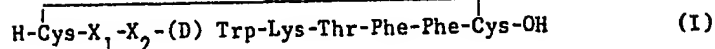
Les dérivés de la présente invention se caractérisent par la présence d'une liaison de type hydrazide à la place de la liaison amide habituelle entre deux acides aminés.

- Ceci se traduit pour les nouvelles molécules par une meilleure résistance à la protéolyse, car ce type de liaison n'est pas reconnu par les enzymes protéolytiques responsables de la dégradation biologique rapide in vivo.

- Une autre conséquence particulièrement importante concerne la dissociation des activités biologiques présentées par les nouvelles molécules par rapport à la somatostatine prise comme produit de référence, aussi bien au niveau de l'inhibition des trois hormones de base impliquées dans le diabète (insuline, glucagon et GH) qu'au niveau de l'inhibition des sécrétions digestives.

- Un autre avantage non négligeable de ces produits se situe au niveau de l'accessibilité chimique. En effet, ces composés sont des nonapeptides et, par voie de conséquence, sont plus faciles à préparer que la somatostatine (14 acides aminés).

Ces produits répondent à la formule générale :



dans laquelle  $X_1$  ou  $X_2$  représentent un groupe de type -NH-A, dans lequel A désigne un reste d'acide  $\alpha$ -aminé et, de préférence -NH-Phe, c'est-à-dire le groupe -HN-NH-CH-CO-



Ces composés sont toujours utilisés sous forme d'un sel d'addition comme le chlorhydrate, le sulfate, phosphate, acétate, malate, citrate, benzoate, succinate, ascorbate... Ces sels pourront être obtenus en dissolvant le composé dans l'eau et en présence de deux équivalents d'acide et en soumettant ensuite l'ensemble à une lyophilisation. Le sel d'addition préféré est l'acétate.

Les produits (I) ont été synthétisés selon la technique de synthèse en phase solide décrite par Merrifield R.B. (J. Amer. Chem. Soc. 1963, 85, 2149-2154).

Le support insoluble utilisé est un polymère à 1 ou 2% de divinylbenzène chlorométhylé, de telle façon qu'il possède de 1 à 3,5 milliéquivalents de chlore par gramme de résine. Les groupements chlorométhyle peuvent être transformés en groupes hydroxyméthyle par des méthodes connues. Le peptide est lié au polymère par une liaison de type ester benzylique.

Le premier aminoacide (aminoacide C-terminal du peptide) est fixé sur la résine selon une méthode connue, de préférence celle de Marglin (Marglin, Tetrahedron Letter, 1971, 3145)

L'aminoacide suivant dont la fonction amine primaire en  $\alpha$  a été protégée par un groupe de type acyle ou uréthane est alors couplé avec le premier aminoacide fixé sur la résine. Comme groupe protecteur de la fonction amine, on utilise de préférence le groupe tertibutyloxycarbonyle (Boc).

Après couplage, on élimine le groupe protecteur de la fonction amine primaire par une méthode convenable. En particulier, dans le cas du groupe Boc, on élimine le groupe protecteur par acidolyse de préférence par l'acide trifluoracétique en solution dans le dichlorométhane, en présence d'agents protecteurs tels que

l'anisole, le thioanisole, l'éthanedithiol ou le mercaptoéthanol.

On répète ensuite les opérations de couplage et de déprotection avec chacun des amino acides suivants. Dans le cas de la cystéinethiol, le groupement thiol doit être protégé par un  
5 groupe protecteur tel que benzyle, benzyle substitué, trityle, benzhydride, acétamidométhyle (Acm). On utilise préférentiellement le groupe Acm. Pour la lysine, la fonction amine en ε doit être protégée.

On peut utiliser les protections décrites dans la  
10 littérature. La protection préférentiellement utilisée ici sera le groupe méthylsulfonyléthoxycarbonyle (Msc).

Enfin, les essais effectués ont montré qu'il n'était pas nécessaire de protéger la fonction alcool de la thréonine d'une part, et le noyau indole du tryptophane, d'autre part.

15 Les aminoacides protégés sont couplés par l'une des méthodes connues, par exemple après activation par le dicyclohexylcarbodiimide (DCCI) ou par formation d'anhydrides mixtes ou esters activés. Préférentiellement, on utilise ici l'activation avec le DCCI en présence d'hydroxybenzotriazole (HOBT) dans un mélange  
20 de diméthylformamide-dichlorométhane (1/1). L'évolution du couplage est suivie par le test à la ninhydrine (Kaiser E. et coll. Analyt. Biochem. 1970, 34, 595).

Lorsque le peptide désiré a été synthétisé sur la résine, il est clivé par une méthode connue. On peut utiliser la  
25 méthode du fluorure d'hydrogène qui élimine en même temps certaines protections. On préfère utiliser ici la transestérification par le méthanol en présence de triéthylamine qui conduit à l'ester méthylique du peptide protégé. Les protections Boc, Msc, ester méthylique et Acm sont éliminées successivement par les méthodes habituelles, avant oxydation.

30 Par exemple, on peut éliminer le Boc par l'acide trifluoroacétique, le Msc et l'ester méthylique par traitement basique (soude ou baryte par exemple) et l'Acm par un sel de métal lourd (mercure ou argent). On élimine préférentiellement les Acm par le nitrate d'argent et on régénère les thiols par barbotage de sulfure d'hydrogène. Parmi les méthodes de cyclisation décrites telles  
35

que l'oxydation par l'air, l'oxygène, l'iode, etc., on utilise préférentiellement le ferricyanure de potassium.

Pour introduire la liaison hydrazide, le procédé le plus aisé consiste à synthétiser au préalable l' $\alpha$ -hydrazinoacide correspondant. Ainsi, l'acide (L)- $\alpha$ -hydrazino- $\beta$ -phénylpropionique peut être préparé selon la méthode de Kazuo et coll. (Tetrahedron Letters, 31, 2701, 1975). Avant son introduction en séquence, la fonction hydrazine a été protégée par le groupement tertbutyloxycarbonyl (Boc).

Les exemples suivants illustrent l'invention sans en limiter la portée.

#### METHODES GENERALES DE SYNTHESE

##### EXEMPLE 1

H-Cys-NH-Phe-Phe-(D)Trp-Lys-Thr-Phe-Phe-Cys-OH (CM 14.455)

##### 15 A) - Mise en place de la Boc-Cys(Acm)-OH sur la résine.

17 g de polymère à 1% de divinylbenzène et substitué à 1,2 milliéquivalent de chlore par gramme sont mis en suspension dans 100 ml de diméthylformamide et on ajoute 23,3 g de Boc-Cys(Acm)-OH. Après 30 min, on ajoute 10 ml de triéthylamine et agite 20 72 h à température ambiante. La résine est alors filtrée, lavée trois fois par du diméthylformamide (DMF), trois fois par un mélange alcool butylique secondaire-eau (3/1 vol/vol), trois fois par l'alcool butylique secondaire, puis quatre fois par du dichlorométhane. Après séchage sous vide, on obtient une résine avec une 25 charge de 0,55 mole d'acide aminé par gramme.

##### B) 1) - Cycle des opérations pour l'introduction d'un acide $\alpha$ -aminé.

L'introduction d'un nouvel acide aminé comprend dans un premier temps une phase de déprotection sélective afin de 30 libérer l'amine de l'acide aminé précédent qui va servir de point d'ancrage pour l'acide aminé suivant.

La déprotection est effectuée par un traitement par l'acide trifluoracétique de la résine dans la cellule de travail. On effectue ensuite une série d'opérations de lavage et neutrali- 35 sation, puis on procède à la phase de couplage du nouvel acide aminé.

suivie elle aussi d'opérations de lavage.

On est amené à effectuer la cascade d'opérations suivantes :

- 1° - Lavage par : acide trifluoracétique/dichlorométhane (4/6)  
5 contenant 5% d'anisole et 5% d'éthanedithiole pendant 5 min (déprotection);
- 2° - répétition de l'opération n° 1 pendant 25 min;
- 3° - lavage par le dichlorométhane : trois fois 2 min;
- 4° - lavage par l'alcool tertioamylique : une fois 2 min;
- 10 5° - lavage par le dichlorométhane : trois fois 2 min;
- 6° - lavage par une solution à 10% de N-éthyl-diisopropylamine dans le dichlorométhane : trois fois 5 min (neutralisation);
- 7° - lavage par le dichlorométhane : trois fois 2 min;
- 8° - lavage par l'alcool tertioamylique : une fois 2 min;
- 15 9° - lavage par le dichlorométhane : quatre fois 2 min;
- 10° - couplage de l'acide;
- 11° - lavage par diméthylformamide-dichlorométhane (1/1) : deux fois 2 min;
- 12° - lavage par le dichlorométhane : une fois 2 min;
- 20 13° - lavage par l'alcool tertioamylique : une fois 1 min;
- 14° - lavage par du dichlorométhane : quatre fois 2 min.

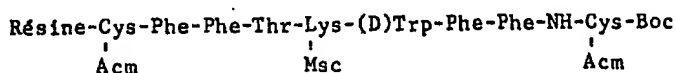
2) - Technique générale de couplage d'un acide  $\alpha$ -aminé.

- On agite pendant 15 min à 0°C le mélange de
- 25 3 équivalents d'acide aminé convenablement protégé (par rapport au peptide accroché sur la résine), 3 équivalents de dicyclohexylcarbodiimide et 3 équivalents d'hydroxybenzotriazole dans un mélange de diméthylformamide-dichlorométhane (1/1 vol/vol). La dicyclohexylurée formée est éliminée par filtration et lavée,
  - 30 puis le filtrat est introduit dans la cellule de travail.

- Si le couplage n'est pas terminé après 1 h (test de Kaiser) on rajoute 1% de N-éthyl-diisopropylamine dans la cellule; si le couplage n'est toujours pas terminé après 3 h, on répète les opérations 7 à 10 du cycle en recouplant avec 1/3 des
- 35 quantités de réactifs.

Quand le couplage est terminé, on effectue les opérations 11 à 14 et on repart à l'opération n° 1 pour l'introduction de l'acide aminé suivant.

En effectuant successivement ces opérations de déprotection et de couplage avec les aminoacides convenables éventuellement protégés dans leurs chaînes latérales, à partir de la cystéine protégée par un groupe acétamidométhyle fixée sur la résine ainsi qu'indiqué au paragraphe A), on obtient le peptide suivant fixé sur la résine :

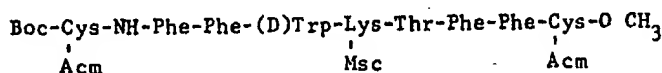


C) - Libération du peptide de son support.

Lorsque tous les aminoacides ont été introduits et que l'on vient de terminer l'opération 14, on sèche la résine. 10 g de peptide résine sont mis en suspension dans 33 ml de diméthylformamide et 66 ml de méthanol; on ajoute 8 ml de triéthylamine et on agite pendant 24 h à température ambiante. La résine est alors filtrée, lavée au diméthylformamide, au méthanol puis au diméthylformamide de nouveau.

Les filtrats sont évaporés à sec sous vide et le résidu redissous dans le méthanol puis le peptide précipité à l'éther.

On obtient ainsi le composé :

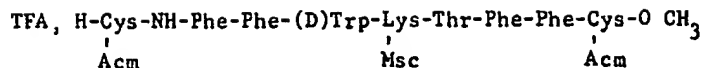


$[\alpha]_D = -12,2'$  (c = 0,5, DMF à 5% AcOH)

D) - Déprotections.

1) - Déprotection du groupement tertibutyloxy-carbonyl (Boc).

6 g du peptide précédent sont agités pendant 35 min dans un mélange formé de 60 ml de dichlorométhane, 70 ml d'acide trifluoracétique, 5 ml d'éthanedithiolet 4 ml d'anisole. Puis le mélange réactionnel est concentré sous vide à 20 ml environ et versé dans un mélange glacé de 150 ml d'isopropanol et 50 ml d'éther. Après 3 h au réfrigérateur, le peptide précipité est filtré, lavé deux fois à l'isopropanol, deux fois à l'éther et séché. On obtient ainsi sous forme de trifluoracétate :



$[\alpha]_D = -9,2$  ( $c = 1$ , diméthylformamide à 5% d'acide acétique).

2) - Déprotection basique (élimination des groupements protecteurs Msc et O CH<sub>3</sub>).

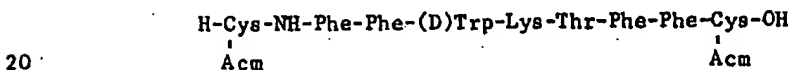
5 5 g du sel obtenu ci-dessus sont dissous dans 150 ml de diméthylformamide additionnés de 15 ml de méthanol. Après refroidissement à 5°C, on ajoute 70 ml d'eau, puis en 15 min 43,5 ml d'une solution de baryte 0,46 N et on laisse remonter la température.

10 Après 40 min d'agitation, on refroidit à 10°C et fait barboter du gaz carbonique jusqu'à pH 7,5, puis on ajoute 90 ml d'eau et continue le barbotage jusqu'à pH 6,5.

Le carbonate de baryum est centrifugé et lavé avec du diméthylformamide. La solution est concentrée sous vide à 20 ml

15 environ et ajoutée à 450 ml d'un mélange acétate d'éthyle-éther (2/1 vol/vol). Après 1 h, le précipité est filtré, lavé à l'isopropanol, à l'éther et séché.

On obtient ainsi le peptide :



$[\alpha]_D = -7$  ( $c = 1$ , diméthylformamide à 5% d'acide acétique).

E) - Libération des thiols des cystéines et création du pont disulfure.

3,80 g de peptide obtenu précédemment sont dissous

25 dans 22 ml d'acide acétique dégazé et on ajoute 190 ml d'eau distillée dégazée. On ajoute alors 28 ml d'une solution de nitrate d'argent 2 N et on agite pendant 16 h sous atmosphère d'azote.

La solution obtenue est concentrée à siccité sous vide; le résidu est cristallisé dans le méthanol puis lavé avec un

30 peu d'eau.

Le sel d'argent ainsi obtenu est alors dissous dans 300 ml de diméthylformamide plus 10 ml d'eau et on fait barboter du sulfure d'hydrogène pendant 10 min à 5°C. Après addition de 200 ml d'eau glacée, le sulfure d'argent est éliminé par centrifugation.

35 La solution est dégazée sous vide et concentrée à 100 ml, puis

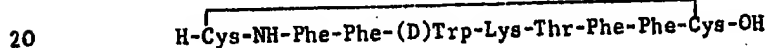


diluée à 7 l par une solution à 2% d'acide acétique dans l'eau dégazée. Cette solution est ajoutée en 18 h à une solution de 5 g de ferricyanure de potassium et 15 g d'acétate d'ammonium dans 4 l d'eau dégazée. Le pH est maintenu à 6,9 par addition d'une solution d'ammoniaque 2 N. 2 h après la fin de l'addition, le milieu réactionnel est acidifié à pH 5 par de l'acide acétique.

Les ions métalliques sont éliminés par passage de la solution sur une colonne de résine Bio Rad AG 3 x A<sub>4</sub> (forme H<sup>+</sup>), puis le peptide est absorbé sur une colonne de résine Bio Rex 70. La colonne est lavée par une solution à 2,5% d'acide acétique, puis le peptide est élué par lavage avec une solution d'acide acétique à 70%. La solution est ensuite évaporée sous vide puis lyophilisée.

Le peptide brut obtenu est purifié par chromatographie sur Sephadex G 25 F en éluant avec de l'acide acétique 30%, puis par chromatographie de partition sur G 25 F par le système butanol-1/eau/acide acétique 4/5/1 (vol/vol). La pureté est vérifiée par chromatographie en couche mince et HPLC.

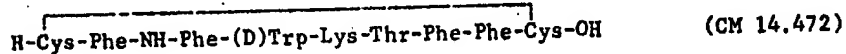
On obtient ainsi :



$[\alpha]_D = -43,5$  ( $c = 0,5$ , acide acétique à 50%).

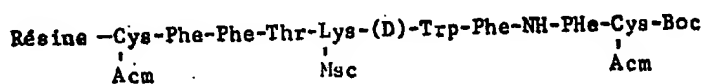
Analyse d'acides aminés conforme à la structure indiquée. Une seule tache en chromatographie en couche mince sur silice avec le système éluant : butanol-1 : 42, pyridine : 24, acide acétique : 4, eau : 30.

25 EXEMPLE 2

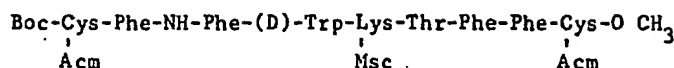


Acm

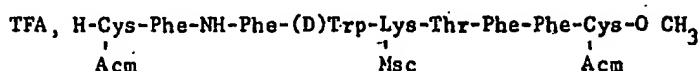
30 A partir de la Boc-Cys-OH fixée sur la résine comme dans l'exemple 1 A), et en effectuant successivement avec les acides aminés convenables les opérations d'élongation et de déprotection ainsi qu'indiqué dans l'exemple 1 B), on obtient fixé sur la résine le peptide :



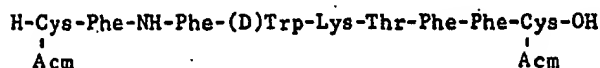
Celui-ci est libéré de la résine comme indiqué à l'exemple 1 C) et conduit à :



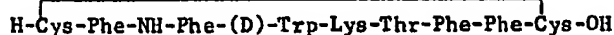
- 5  $[\alpha]_D = -35,5^\circ$  ( $c = 0,5$ , diméthylformamide à 5% d'acide acétique).  
Après déprotection acide comme dans l'exemple 1 D) 1), on obtient le trifluoracétate :



- 10  $[\alpha]_D = -29,7^\circ$  ( $c = 1$ , diméthylformamide à 5% d'acide acétique).  
Ensuite, par déprotection basique comme indiqué dans l'exemple 1 D) 2), on aboutit à :



- 15  $[\alpha]_D = -19,6^\circ$  ( $c = 1$ , diméthylformamide à 5% d'acide acétique).  
Enfin, après libération des fonctions thiol et cyclisation comme indiqué dans l'exemple 1 E), on obtient CM 14.472.



- $[\alpha]_D = -16,6^\circ$  ( $c = 0,6$ , acide acétique à 33%).  
20 L'analyse d'acides aminés est conforme à la structure proposée.

- De plus, par chromatographie en couche mince sur plaque de silice avec le système éluant : butanol-1 : 42, pyridine : 24, acide acétique : 4, eau : 30 (en volume), on obtient une seule  
25 tache.

- Les produits selon l'invention ont été soumis à des essais biologiques, en particulier pour déterminer leur action sur sécrétions d'hormone de croissance, d'insuline et de glucagon, ainsi que sur la sécrétion gastrique.

- 30 L'inhibition de la sécrétion des hormones pancréatiques et de l'hormone de croissance (GH) a été déterminée in vivo chez des rats mâles Sprague Dawley de 200 à 220 g. Les dosages d'insuline, glucagon et d'hormone de croissance sont effectués par

les techniques radioimmunologiques.

L'inhibition de sécrétion gastrique acide a été étudiée in vivo sur des échantillons de muqueuses gastriques isolées de cobaye.

5 Dans chaque cas, on a déterminé la concentration du peptide étudié qui inhibe de 50% la sécrétion hormonale ou muqueuse étudiée.

Les résultats obtenus sont exprimés en comparaison avec ceux obtenus avec la somatostatine elle-même auxquels a été  
10 attribuée la cotation 100.

	Insuline	Glucagon	GH	Sécrétion gastrique
Somatostatine	100	100	100	100
CM 14.472	inactif	84	263	inactif

15 Les peptides de la présente invention inhibent fortement la sécrétion d'hormone de croissance et, par suite, peuvent être utilisés dans le traitement de l'acromégalie.

Par ailleurs, ils présentent une action inhibitrice très différenciée sur les sécrétions d'insuline et de glucagon.  
20 Ceci permet de les utiliser dans le contrôle du diabète sucré insulino ou non insulino dépendant.

Par ailleurs, ces produits ont peu ou pas d'action sur les sécrétions gastriques, ce qui représente dans ce cas un avantage par rapport à la somatostatine.

25 Les produits selon l'invention ont une faible toxicité; dans aucun cas, lors des essais, les animaux n'ont montré de symptômes alarmants.

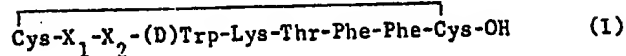
Les peptides de la présente invention peuvent être utilisés en thérapeutique par voie injectable, intraveineuse, intra-  
30 musculaire ou sous-cutanée. Ils sont utilisés en solution dans un solvant tel que le sérum physiologique (solution saline isotonique)

ou dans un tampon tel que le tampon phosphate; la solution saline peut avantageusement avoir une concentration de 1 à 5% en poids.

La posologie varie suivant les effets thérapeutiques recherchés et la gravité de l'affection à traiter. Elle doit être  
5 déterminée pour chaque patient; elle est en général comprise entre 0,1 et 10 mg de principe actif.

# REVENDICATIONS

1 - Analogues de la somatostatine, caractérisés en ce qu'ils répondent à la formule :



5 dans laquelle  $X_1$  ou  $X_2$  représentent un groupe de type  $-\text{NH-A}$ , dans lequel A désigne un reste d'acide  $\alpha$ -aminé et de préférence  $-\text{NH-Phe}$ , c'est-à-dire le groupe  $-\text{HN-NH-CH-CO-}$



10 et les sels pharmaceutiquement acceptables de ces produits.

2 - Médicaments utiles notamment pour lutter contre les maladies résultant d'un dérèglement de la sécrétion d'hormones, d'insuline ou de glucagon, caractérisés en ce qu'ils contiennent au moins un produit selon la revendication 1.

15 3 - Médicaments selon la revendication 2, caractérisés en ce qu'ils sont administrés par voie injectable.

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**